

ZÁRÓJELENTÉS

Az alacsonyhőmérsékleti stressz hatására indukálódó regulátor gének vizsgálata búzában

OTKA nyilvántartási szám: T046573

A munka kezdete és befejezése: 2004. – 2007.

A pályázatunk kutatási tervének alapjául a 2003-ban publikált eredményeink (Vágújfalvi és mtsi.) szolgáltak. E kísérletek során alakorban (*T. monococcum*) egy új fagyállóságért felelős génlókusz (*Fr-A^m2*) térképeznünk az 5A kromoszóma hosszúkarján. Azonos pozícióba térképeztünk egy hideg-indukálható gén, a *Cor14b* gén expressziójáért felelős mennyiségi lókusz (QTL) is, továbbá ugyan erre a helyre térképeztük a transzkripciósfaktort kódoló *Cbf3* gén lókuszát is.

Pályázatunk kutatási tervében vázoltuk, munkánk során tisztázni kívánjuk, mi a kapcsolat e három *T. monococcum*-ban térképezett gén között. Munkatervünkben célul tűztük ki annak vizsgálatát is, hogy a kenyérbúza 5A kromoszómáján is megtalálható-e ez a második, valószínűleg kisebb hatású fagyállósági gén, az *Fr-A2*. E vizsgálatokhoz az e régió felbontására létrehozott, finomtérképezést is lehetővé tevő térképezési populációt analízisét terveztük. Kutatási tervünkben szerepelt továbbá, hogy tanulmányozzuk, milyen regulátor gének expressziója változik meg hideg-stressz hatására búzában. Tisztázni kívántuk, hogy ezek közül mely gén lokalizálható az 5A kromoszómán.

Zárójelentésünkben beszámolunk arról, hogy a vállalt feladatok nagy részét teljesítettük, mely részfeladat elvégzését nem teljesítettük, és miért; továbbá, hogy milyen, a témával kapcsolatos, azzal szorosan összefüggő, abból következő olyan feladatokat teljesítettünk, melyek a kutatási tervben nem szerepeltek.

A tervezettektől való eltérésnek két oka van. Az egyik az, hogy a gabonafélék *Cbf* génjeinek kutatása „forró téma”, jó néhány külföldi laboratórium is ezzel a témával foglalkozik. Néhány esetben célszerűtlennek tartottuk az általuk kapott kísérleteket megismételni a mi rendszerünkön, másrészt, a más kutatócsoportok által publikált eredmények alapján néhány, általunk korábban kitűzött cél értelmetlenné vált. A másik ok pedig, hogy kutatásainkat mintegy másfél évtizedre visszanyúlóan, nemzetközi kooperációban, három laboratórium (külföldi partnerek: Jorge Dubcovsky, University of California, USA és Luigi Cattivelli, Experimental Institute for Cereal Research, Italy) összehangolt munkájával végezzük. Az összehangolt munka eredményeinek

következményeként újabb kérdések merültek fel, melyek újabb (előre nem tervezett) kutatási irányokat nyitottak meg.

A *Cbf* transzkripció faktorok expressziójának vizsgálata Northern analízissel és Real Time RT-PCR technikával.

Korábbi kísérleteink során (Vágújfalvi és mtsi., 2003) igazoltuk, hogy az árpából izolált *Cbf3* gén a kenyérbúza 5A kromoszómájának hosszúkarjára térképeződik, pontosan arra a helyre, ahol az általunk újonnan térképezett *Fr-A^m2* fagyállósági QTL maximuma térképeződött.

Számos (részben kutatócsoportunk által korábban publikált) irodalmi adat bizonyítja, hogy a kenyérbúza abiotikus stressz-toleranciájának szabályozásában kiemelkedő szerepe az 5A kromoszómának van. Munkánk során a kérdés annak tisztázása volt, hogy a *Cbf* gének expressziójának genetikai kontrolljában szerepet játszik-e az 5A kromoszóma. E kérdés megválaszolásához a CS/CNN (CS: tavaszi; CNN: őszi búza) szubsztitúciós vonalak vizsgálatát tartottuk megfelelőnek. Olyan kromoszómák szerepét vizsgáltuk, melyekről irodalmi adatok alapján tudtuk, hogy a búza fagyállóságának kialakításában szerepet játszanak. Vizsgálatainkhoz a növényeket alacsony hőmérsékleti (2°C, 2 óra) stressznek tettük ki, a növényekből totál-RNS-t izoláltunk. A génexpressziót Northern analízissel tanulmányoztuk, melyhez jelölő próbaként a *Cbf* gének „AP2-*Cbf*” konzervatív szekvenciáját használtuk. E próba alkalmazása lehetővé tette, hogy a *Cbf* génexpresszióról egy általános képet kapjunk; valamennyi *Cbf* gén expresszióját tanulmányozzuk. Megállapítottuk, hogy a kontroll növényekhez képest valamennyi hidegkezelt vonalban megnőtt az expresszió. A legnagyobb mértékű expressziót az 5A szubsztitúciós vonalban tapasztaltunk, ami egyértelműen bizonyította, hogy a *Cbf* gének szabályozásában kiemelkedő szerepe az 5A kromoszómának van. Felvetődött a kérdés: e kromoszóma melyik része játszik szerepet a génszabályozásban? A Northern analízishez a továbbiakban olyan, egyetlen kromoszómára rekombináns vonalakat használtunk, ahol az egyes vonalakban a rekombináció az 5A kromoszóma egy szűkebb területén, a fagyállósági lókuszt területén, különböző helyeken történt. A rekombináns vonalak előállításához a szülői partnerek a CS/TSP5A és a CS/CNN5A vonalak voltak (Galiba és mtsi., 1995). A rekombináns vonalak egyik csoportjában - induktív hőmérsékleten - erős génexpressziót mutattunk ki, míg a másik csoportban a gén kevésbé fejeződött ki. A rekombináns vonalak 5A kromoszómájának vizsgált szakasza RFLP markerekkel jellemezett. Az egyes vonalak allél-mintázatát

összehasonlítva a *Cbf* génexpresszió mértékével megállapítottuk, hogy az erős expressziót mutató genotípusok abban közösek, hogy a *Xpsr911* és az *Xpsr637* RFLP lókuszon valamennyien a fagyálló szülőtől származó allélt, míg a kismértékű expressziót mutató genotípusok ezeken a lókuszokon a fagyérzékeny szülőtől származó alléleket hordoznak. A *Cbf* gének expressziója és a fagyállóság mértéke közti összefüggést szelektált rekombinációs vonalak és a két szülői vonal fagytesztjével igazoltuk. A fagyteszt eredményei azt is valószínűsítették, hogy kenyérbúzában is létezik egy proximálisan lokalizálható, fagyállóságot meghatározó *Fr-A2* lókusz. E kísérlet eredményeit felhasználva, összehasonlító térképezési adatokkal mutattunk rá, hogy a *Cbf* gének expresszióját az 5A kromoszóma azon régiója szabályozza, ahová korábbi munkánk során alakorban az új fagyállósági QTL-t, az *Fr-A^m2*-t térképeztük.

A Northern analízissel végzett kísérletek a *Cbf* gének expressziójáról csupán egy általános képet adtak (az alkalmazott hibridizációs próba jellegénél fogva). Az egyedi *Cbf* gének vizsgálatát a nemzetközi kooperáció tette lehetővé. Az amerikai partner alakorban, BAC klónok segítségével, 13 *Cbf* gént azonosított (Miller és mtsi., 2006). A BAC klónok segítségével lehetővé vált az egyes *Cbf* gének szekvenciájának meghatározása, e szekvenciákat a partnerünk rendelkezésünkre bocsátotta. Így lehetőségünk nyílt arra, hogy az egyes *Cbf* génekre gén-specifikus primereket tervezzünk, és a gének expresszióját szemi-kvantitatív, majd Real Time RT-PCR-rel tanulmányozzuk kenyérbúzában. Fagyérzékeny és fagyálló búza genotípusok szemi-kvantitatív RT-PCR-jével megállapítottuk, hogy a *Cbf9* gén nem, míg a többi gén hideg-indukálható. A Real Time RT-PCR rendszer megbízhatóságát a konstitutívan expresszálódó aktin gén analízisével igazoltuk. Az egyes gének expressziójának mértékének analíziséhez a CS/TSP5A és a CS/CNN5A vonalak mellett két olyan rekombinációs vonalat tanulmányoztunk (46-1 és 38-6), melyekben a Northern analízis alapján eltérőnek bizonyult a *Cbf* génexpresszió. A genotípusok között az egyes gének expressziójának mértékét a CS/TSP5A-ban mért expresszióhoz viszonyítottuk, ezt a szintet vettük egységnyinek. Megállapítottuk, hogy három gén, a *Cbf14*, a *Cbf15* és a *Cbf16* expressziójának mértéke volt kiemelkedően magas az alacsony hőmérsékleti-stressz során; 11-szeres, 6-szoros, illetve 5-szörös mértékű expressziót detektáltunk. Kísérleteinkből azt a következtetést vontuk le, hogy ez az a három *Cbf* gén, amely a fagyállóság mértékét befolyásolja kenyérbúzában.

Ezen eredményeiből a következő publikáció született:

Vágújfalvi A., Aprile A., Miller A., Dubcovsky J., Delugu J., Galiba G., Cattivelli I. (2005): *The expression of several Cbf genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat. Molecular General Genomics* 274:5 506

Az *Fr-A2* gén térképezéshez a fagyállósági tesztek kivitelezése a finomtérkép elkészítésére alkalmas populációkon. A térképek elkészítése. Az *Fr-A2*, a *Cbf3* és a *Cor14b* gén expresszióját szabályozó gén viszonyának tisztázása.

Munkatervünkben vállaltuk, *T. aestivum*-ban is térképezzük a *Cbf3* és az *Fr-A2* gént. Azonban az árpában Francia és mtsi. (2004) által kapott eredmények a mi eredményeinket messzemenően megerősíteték: az árpa (homológ) 5H kromoszómáján ugyan abba a pozícióba, ugyan arra a helyre térképeződnek az átlunk térkezett gének, mint a búza 5A kromoszómáján, ezért nem tartottuk kellően indokoltnak e kérdés vizsgálatát. A későbbi munkák árpában (Skinner és mtsi., 2006; Tondelli és mtsi., 2006) és búzában (Baga és mtsi., 2007) is megerősítették eredményeinket. Ahelyett tehát, hogy kenyérbúzában is térképezzük volna az *Fr-A2* QTL-t és a *Cbf3* gént (az *Fr-A2* lókuszt létét kenyérnúzában igazoltuk, amint az fentebb kifejtettük) arra voltunk kíváncsiak, melyik *Cbf* gén játszik ténylegesen szerepet a fagyállóság kialakításában. E munka eredményei sokkal több információhoz, új tudományos ismerethez vezethetnek, mint a munkatervben megfogalmazott cél (hexaploid rendszerben is igazolni a diploid rendszerben kapott eredményeket), nevezetesen: bizonyítjuk, hogy egy komplex fenotípus, a fagyállóság kialakításában mely (*Cbf*) gének játszanak fontos szerepet.

A kérdés megválaszolásához egy új térképezési populációt kell előálltanunk, megpróbálva az egyes *Cbf* géneket egymástól rekombinációval elválasztani. E populáció fagytesztje választ adhat a felvetett kérdésre. Munkánkat célszerűnek láttuk diploid rendszerben elvégezni; egyrészt, mert ez esetben nem kell számolnunk a hexaploid búza B és D genomjának zavaró hatásával, másrészt, mert a *T. monococcum* teljes genomja BAC könyvtárban rendelkezésre áll, ami lehetővé teszi a molekuláris genotipizálást; míg ilyen könyvtár, információ, *T. aestivum* esetében nem áll rendelkezésünkre.

Az újonnan előállított térképezési populációból RFLP markerek segítségével válogattuk ki azokat a rekombináns növényeket, amelyekben a rekombináció a minket érdeklő, a *Cbf* géneket tartalmazó, nagyon kis kromoszóma-szakaszon (0,8cM) történt. Azt, hogy a régió belül pontosan hol, melyik *Cbf* gén között történt a rekombináció, a BAC klónok szekvenciájának adatai alapján kifejlesztett CAPS markerekkel határoztuk meg. Az ily módon genotipizált térképezési populációt egymást követő két évben is fagytesztnek vetettük

alá, és statisztikai analízissel bizonyítottuk, mely *Cbf* gének involváltak a fagyállóság genetikai kontrolljában. Bár nem sikerült minden egyes *Cbf* gént rekombinációval elválasztanunk - aminek magyarázata a tanulmányozott nagyon kis genetikai távolság -, azonban a rendszer lehetővé tette, hogy azonosítsuk: három *Cbf* gén, a *Cbf12*, *Cbf14* és a *Cbf15* az, amelyek a fagyállóság kialakításához hozzájárul alakorban. Eredményeinket egyértelműen megerősítette az amerikai partner további kísérlete: hideg-indukálható gének (*Cor14b* és *Dhn5* /dehidrin/) expressziójának tanulmányozása ugyanezen három *Cbf* gén szerepét igazolta.

Az eredményeink helyességét igazolja a két rendszerben kapott adatok összevetése. Két független rendszerben és metodikával (génexpressziós vizsgálatok kenyérbúzában és fagyteszt alakorban) végzett kísérletek két *Cbf* gén szerepét egyértelműsítik az alacsonyhőmérsékleti stressz-tolerancia kialakításában: a *Cbf14* és a *Cbf15* génekét. Munkánk folytatásaként e gének szerepét transzformációval kívánjuk igazolni.

Eredményeinket a Plant Molecular Biology c. folyóirat közlésre elfogadta:

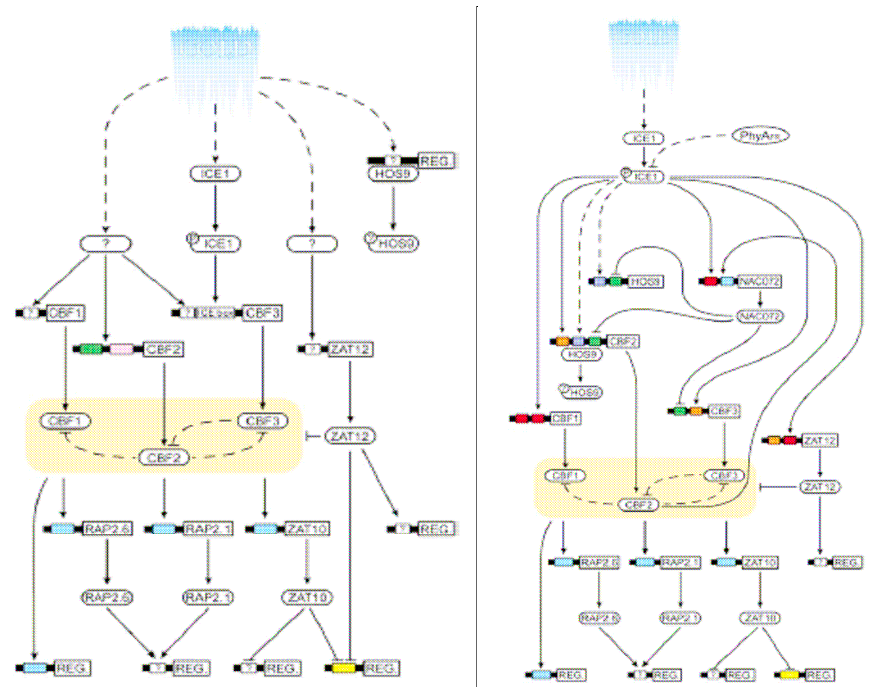
Knox, A.K., C. Li, A. Vágújfalvi, G. Galiba, E.J. Stockinger, and J. Dubcovsky. 2008. Identification of candidate CBF genes for the frost tolerance locus Fr-Am2 in Triticum monococcum. Plant Molecular Biology. In press.

***Cbf*, és más, az alacsonyhőmérsékleti stressz hatására indukálódó regulátor gének RFLP térképezése a búza 5A kromoszómáján.**

A kutatási koncepciónk az volt, hogy kiderítsük, az 5A kromoszómán lokalizálható-e az alacsonyhőmérsékleti stressz-toleranciát, fagyállóságot befolyásoló, a *Cbf* géneken kívül más transzkripciós faktorok génjei is. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, a kenyérbúzában térképezett *Fr-A1* és az attól proximálisabban elhelyezkedő (alkorban térképezett) *Fr-A2* QTL régiójába térképezhető-e ilyen regulátor gén lókusza? Amint az Tondelli és mtsi. (2006) árpában végzet kutatásaiból kiderült, a *Cbf* géneken kívül az 5H kromoszómán nem lokalizálhatók az alacsonyhőmérsékleti stressz-regulációban szerepet játszó transzkripciós faktorok génlókusza. Az árpa és a búza 5-ös kromoszómái között meglévő homológia alapján feltételezhetően ugyan ez igaz a búza 5A kromoszómájára is. A kutatási koncepciónk szempontjából indifferens volt, hogy mely kromoszómákra térképezhetők ilyen gének, számunkra a fontos az volt, hogy nem az 5A-ra. Ezért inkább annak a kérdésnek a

megválaszolását tűztük ki célul, hogy az ilyen transzkripciós faktorok expressziója (tehát a regulációja, és nem maga a struktúrgén) kapcsolható-e az 5A kromoszómához?

Mivel az alacsony hőmérsékleti stressz-tolerancia molekuláris értelmezése napjaink egyik intenzíven kutatott területe, ezért újabb és újabb modellek látnak napvilágot; két lehetséges modellt az 1. ábrán mutatunk be.



1. ábra

Az alacsony hőmérsékleti szignáltranszdukció két lehetséges modellje, az abban részt vevő transzkripciós faktorok lehetséges kapcsolatainak feltüntetésével (Benedict és mtsi., 2006).

Az irodalom részletes áttekintése után (összefoglaló: Chinnusamy és mtsi., 2007) kiválasztottuk azokat a géneket, melyeket tanulmányozni kívántunk. Munkánkhoz elsősorban a *Cbf*-regulációs úthoz kapcsolódó transzkripciós faktorokat választottuk ki, de tanulmányunkba bevontunk néhány, ez úttól független gén analízisét is. Sok esetben az általunk kiválasztott, tanulmányozni kívánt géneket *Arabidopsis*-ból írták le, ezért adatbázisokban (NCBI, GrainGenes, TIGR) megkerestük (BLAST) a homológ búzaszekvenciákat. E szekvencia-adatok ismeretében primereket terveztünk, hogy szemi-kvantitatív PCR-rel vizsgálni tudjuk búzában a génexpressziót. Kezdeti lépésként fagyálló és fagyérzékeny búzavonalkat vizsgáltunk. Tervünk szerint, amennyiben expressziós különbséget sikerül kimutatnunk a kétféle csoport között, következhet majd a kromoszómális

lokalizációt lehetővé tevő, speciális genetikai anyag (szubsztitúciós és rekombináns vonalak) analízise. A hideg-stresszelt fagyálló és fagyérzékeny növényekből össz-RNS-t izoláltunk, azokról cDNS-t írtunk, majd optimalizáltuk a PCR reakciókat. Expressziós különbséget csak a *Cbf*-úttól független *Hos10* gén esetében találtunk. Konstitutív expressziót mutatunk ki a *Cbf*-regulációs kaszkádkhoz kapcsolódó *Esk1*, *Nac072*, *Hos9*, *Hos1* és a *Zat12* gének esetében. E kérdéskör vizsgálatát érdekesnek és indokoltnak tartjuk, mert felveti a kérdést: ha a *Cbf* géneket szabályozó regulátorok expressziójában nincs különbség (konstitutív expresszió), akkor a fagyállóság kialakításában (általunk is) bizonyítottan szerepet játszó *Cbf* gének expresziós különbsége minek tulajdonítható? Jelenleg a kísérletek elején tartunk, de a munka folytatását indokoltnak tartjuk.

Hivatkozott irodalmak jegyzéke:

- Baga M, Chodaparambil SV, Limin AE, Pecar M, Fowler DB, Chibbar RN. (2007) Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Funct Integr Genomics*. 7: 53-68
- Benedict C, Geisler M, Trygg J, Huner N, Hurry V. (2006): Consensus by democracy. Using meta-analyses of microarray and genomic data to model the cold acclimation signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 141:1219-32.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. (2007): Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*. 12:444-51.
- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Tóth B, Hayes PM, Skinner JS, Pecchioni N. (2004): Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theor Appl Genet*. 108:670-80
- Galiba G, Quarrie SA, Sutka J, Morgounov A, Snape JW (1995): RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor App Genet*. 90: 1174–1179
- Miller AK, Galiba G, Dubcovsky J.(2006) A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-Am2 in Triticum monococcum. *Mol Genet Genomics* 275: 193-203
- Skinner JS, Szucs P, von Zitzewitz J, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, Stockinger EJ, Thomashow MF, Chen TH, Hayes PM. (2006) Mapping of barley homologs to genes that regulate low temperature tolerance in Arabidopsis. *Theor Appl Genet*. 112: 832-42
- Tondelli A, Francia E, Barabaschi D, Aprile A, Skinner JS, Stockinger EJ, Stanca AM, Pecchioni N. (2006): Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theor Appl Genet*. 112:445-54.

Vágújfalvi A, Galiba G, Cattivelli L, Dubcovsky J. 2003. The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A. *Mol. Genet. Genomics* 269: 60–67